

• 论著 •

Kv1.3 在动脉粥样硬化大鼠主动脉的表达变化

王焱 李桂阳 李枚娟 巩燕 肖国胜 常贺 陈航姿 姚路明 王维嘉

【摘要】 目的 探讨动脉粥样硬化(AS)大鼠主动脉病变局部离子通道 Kv1.3 的表达水平及作用。方法 雄性 Wistar 大鼠 16 只,随机分为两组:正常组(8 只,予普通饮食+0.9%氯化钠溶液)和 AS 组(8 只,予高脂饮食+维生素 D₃ 负荷)。采用组织病理学检查,观察主动脉粥样硬化病变。采用实时定量反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western 印迹法检测主动脉病变局部 Kv1.3 和白细胞介素(IL)-2、干扰素(IFN)- γ 的表达水平。结果 组织病理学检查证实纤维增生性 AS 斑块。AS 组的 Kv1.3 mRNA 为 $(31.48 \pm 8.64) \times 10^{-3}$,显著高于正常组的 $(3.28 \pm 0.79) \times 10^{-3}$ ($P = 0.012$)。AS 组的 Kv1.3、IL-2、IFN- γ 蛋白表达量分别为 0.691 ± 0.067 、 0.611 ± 0.055 、 0.759 ± 0.050 ,均显著高于正常组的 0.490 ± 0.052 、 0.299 ± 0.058 、 0.273 ± 0.052 (P 值均 < 0.01)。结论 Kv1.3 在主动脉粥样硬化病变局部的表达增高。Kv1.3 可能在 AS 的发生和发展过程中发挥着重要的作用。

【关键词】 离子通道; 动脉粥样硬化; 细胞因子; 免疫细胞

Expression profile of voltage-gated potassium channel Kv1.3 in aorta of atherosclerosis rats · WANG Yan, LI Guiyang, LI Meijuan, GONG Yan, XIAO Guosheng, CHANG He, CHEN Hangzi, YAO Luming, WANG Weijia. Department of Cardiology, Affiliated Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian, China

Corresponding author: WANG Yan. E-mail: wy@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the expression of voltage-gated potassium channel Kv1.3 in the aorta of a rat model of atherosclerosis and its role in the progress of atherosclerotic plaque formation. Methods A total of 16 male Wistar rats were randomly divided into normal control (normal diet and saline) and atherosclerosis group (high lipid diet+ Vitamin D₃ overload), with 8 rats in each group. In 16 weeks later, all rats were killed after weighing, and their blood samples and aorta were collected. Pathological changes of the rat aortic artery were observed with HE staining. Real time RT-PCR and Western blotting analysis were used to determine the mRNA and protein expression of Kv1.3 and the protein expressions of interleukin (IL)-2 and interferon (IFN)- γ . Results Pathological changes showed that fiber proliferative atherosclerotic plaques were found in the aorta of atherosclerosis group, with inflammatory cells infiltrating in the local lesion. Real time RT-PCR analysis showed that the expression of Kv1.3 mRNA in the aorta was increased significantly in the atherosclerosis rats than that in the controls ($[31.48 \pm 8.64] \times 10^{-3}$ vs. $[3.28 \pm 0.79] \times 10^{-3}$, $P < 0.05$). Western blotting analysis showed that the protein expression of Kv1.3, IL-2 and IFN- γ in the aorta were also increased significantly in the atherosclerotic rats than that in the controls (Kv1.3 [0.691 ± 0.067] vs. [0.490 ± 0.052], IL-2 [0.611 ± 0.055] vs. [0.299 ± 0.058], IFN- γ [0.759 ± 0.050] vs. [0.273 ± 0.052], $P < 0.01$ n = 8). Conclusion The expression of Kv1.3 potassium channels is increased in the plaques of atherosclerotic rats. Kv1.3 may play an important role in the development and progression of atherosclerosis. (Shanghai Med J, 2011, 34: 186-189)

【Key words】 Ion channel; Atherosclerosis; Cytokines; Immune cells

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30871045)

作者单位: 361004 厦门, 厦门大学附属中山医院心内科(王焱、李桂阳、李枚娟、巩燕、肖国胜、常贺); 厦门大学生命科学院(陈航姿、姚路明、王维嘉)

通信作者: 王焱, 电子邮箱为 wy@medmail.com.cn

动脉粥样硬化(AS)是以免疫活动为特征的慢性炎症疾病,其发生和发展涉及机体固有免疫和适应性免疫应答^[1,2]。研究发现,免疫细胞的活化与其细胞膜上离子通道的电生理活动密切相关。

Kv1.3 通道是效应性 T 淋巴细胞持续活化的关键^[34],其在巨噬细胞向泡沫细胞分化的过程中也发挥重要作用,可能是巨噬细胞源性泡沫细胞形成的分子及电生理学基础^[5]。本研究通过建立 AS 模型,观察 AS 病变局部 Kv1.3 的表达变化,探讨 Kv1.3 通道在 AS 进程中的潜在作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 Wistar 大鼠(上海斯莱克实验动物有限公司),高脂饲料(江苏省苏州双狮实验动物饲料科技有限公司),维生素 D₃(上海通用药业股份有限公司),总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(北京北化康泰临床试剂有限公司),Trizol 提取液(美国 Invitrogen 公司),一步法反转录(RT)-聚合酶链反应(PCR)试剂盒(加拿大 Fermentas 公司),SYBR Green 实时定量 PCR Master Mix-plus(日本 Toyobo 公司),兔抗大鼠 Kv1.3、白细胞介素(IL)-2、干扰素(IFN)- γ 抗体、小鼠抗大鼠 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG、HRP 标记兔抗小鼠 IgG(英国 Abcam 公司),Model 3550 酶标仪(美国伯乐公司),实时荧光定量 PCR 仪 Rotor Gene 3000(澳大利亚 Corbett Research 公司),电泳槽、电转槽(美国伯乐公司)。

1.2 AS 大鼠模型的建立 雄性 Wistar 大鼠 16 只,体重 200~220 g,随机分为正常组(8 只)和 AS 组(8 只)。正常组给予普通饮食+0.9%氯化钠溶液(喂食开始时一次性腹腔注射等体积 0.9%氯化钠溶液),AS 组给予高脂饮食+维生素 D₃ 负荷(喂食开始时一次性腹腔注射维生素 D₃ 60 万 U/kg),试验周期为 16 周。高脂饮食配方:3%胆固醇、0.3%胆酸钠、5%蛋黄粉、0.2%丙基硫氧嘧啶、5%白糖、10%猪油、15%全脂奶粉、61.5%基础饲料。饲养 16 周后称重,予水合氯醛腹腔注射进行麻醉,心脏采血,处死,快速分离大鼠主动脉标本。

1.3 血脂的测定 心脏采血,将新鲜血液静置 2~3 h,待血块收缩完全,1200 \times g 离心 15 min 后提取血清,分别采用不同的酶法,应用酶标仪测定光密度(D)值,根据标准液计算 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C。

1.4 主动脉标本留取和组织病理学检测 采血后处死大鼠,立即分离主动脉,从主动脉起始部至

腹主动脉分叉处剥离全长主动脉,纵向剪开,截取胸主动脉和腹主动脉约 0.5 cm 长的血管环,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,5 μ m 连续切片,10 μ m 间隔采集切片,采用苏木精-伊红(H-E)染色。选取其余主动脉组织 50~100 mg 冻存于液氮。

1.5 实时定量 RT-PCR 检测血管组织中 Kv1.3 的表达 将液氮冻存的主动脉组织剪碎,于一次性组织研磨器上研磨,匀浆,抽提组织总 RNA,并测定其浓度和纯度,采用一步法 RT-PCR 试剂盒,反转录 cDNA。Kv1.3 引物序列:上游 5'-TGC TGG TGC GAT TCT TTG CTT-3',下游 5'-CCT GCT GCC CAT TAC CCT GTG-3'(扩增片段长度为 141 bp)。GAPDH 引物序列:上游 5'-GGC ATC GTG GAA GGG CTC ATG AG-3',下游 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGG-3'(扩增片段长度为 188 bp)。引物参照基因库提供的序列,应用 Primer 5.0 软件自行设计,由美国 Invitrogen 公司合成。应用 SYBR Green I 荧光染料技术行实时定量 RT-PCR 反应,并行琼脂糖凝胶电泳检测产物,应用凝胶成像系统拍摄。实时定量 RT-PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C \times 1 min,95 $^{\circ}$ C \times 15 s,60 $^{\circ}$ C \times 15 s,72 $^{\circ}$ C \times 40 s,获取荧光值,共 40 个循环;获取融解曲线。以原液进行梯度稀释,制作 GAPDH 和 Kv1.3 标准曲线,验证两者扩增效率的一致性。内参基因 GAPDH 与目的基因 Kv1.3 扩增效率具有一致性,可采用相对定量法进行比较^[6]。通过内参基因 GAPDH 定量结果对目的基因 Kv1.3 定量值进行归一化处理,计算每份样本的 2^{- Δ Ct} 值。

1.6 Western 印迹法检测 Kv1.3 和 IL-2、IFN- γ 蛋白质表达量 抽提上层 RNA 后,用无水乙醇将中层的 DNA 沉淀,去除 DNA 后,加入异丙醇沉淀蛋白,以变性剂盐酸胍洗涤,干燥后再用尿素溶液溶解,并用超声破碎,离心后取上清液,采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定蛋白浓度。将等量待分离的蛋白溶液与等体积的上样缓冲液(含溴酚蓝)混合,煮沸,加样。以 100 g/L SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺)凝胶电泳分离,电转移蛋白至硝酸纤维素膜,0.5%脱脂奶粉封闭,孵育 1 h 后弃去封闭液,分别加入兔抗大鼠 Kv1.3、IL-2、IFN- γ 抗体及小鼠抗大鼠 β -actin 抗体,室温孵育 2~3 h,弃去一抗,TBST 洗涤 3 次各 5 min。弃去 TBST,再分别加入 HRP 标记羊抗兔 IgG 和

兔抗小鼠 IgG, 孵育 1~ 2 h, 弃去二抗, TBST 洗涤 3 次各 10 min。弃去 TBST, 采用电化学发光法 (ECL) 将显色液显色, 中止反应, 压片曝光。以 β -actin 作为内参确定上样的一致性。应用凝胶图像分析系统检测蛋白印迹条带灰度。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 11.5 统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结 果

表 1 饲养 16 周后两组大鼠血脂水平和体重变化

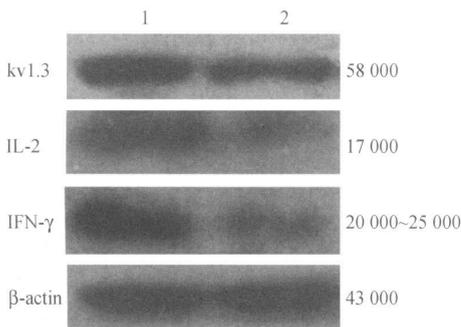
组别	TC	TG	LDL-C	HDL-C	体重
	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	kg
正常	2.50±0.60	2.40±0.84	1.64±0.40	1.36±0.35	0.442±0.032
AS	8.21±2.56 ^①	2.76±0.32	6.41±1.86 ^①	1.51±0.45	0.240±0.023 ^①

与正常组比较: ① $P < 0.01$

2.2 两组大鼠的主动脉组织病理学检查比较 正常组动脉的内、中、外膜的分界清楚, 管腔由单层内皮细胞覆盖, 内皮光滑完整, 主动脉平滑肌排列整齐规则, 未见增生、钙化及泡沫细胞形成。AS 组内、中、外膜的分界不清, 管壁明显增厚, 表面内皮细胞受损, 部分脱落, 内皮层增厚, 内皮下层可见泡沫细胞; 中膜层平滑肌细胞增生明显, 排列紊乱, 伴点状钙化, 弹性纤维层结构不清, 纤维组织增生, 形成纤维增生性 AS 斑块。见图 1(见插页)。

2.3 实时荧光定量 RT-PCR 的相对定量结果 AS 组的 Kv1.3 mRNA 水平为 $(31.48 \pm 8.64) \times 10^{-3}$, 显著高于正常组的 $(3.28 \pm 0.79) \times 10^{-3}$ ($P = 0.012$)。

2.4 两组间 Kv1.3、IL-2、IFN- γ 蛋白表达量的比较 AS 组的 Kv1.3、IL-2 和 IFN- γ 蛋白表达量分别为 0.691 ± 0.067 、 0.611 ± 0.055 、 0.759 ± 0.050 , 均显著高于正常组的 0.490 ± 0.052 、 0.299 ± 0.058 、 0.273 ± 0.052 (P 值均 < 0.01)。见图 2。



1: AS 组; 2: 正常组

图 2 Western 印迹法检查 Kv1.3、IL-2、IFN- γ 蛋白的表达量

2.1 两组大鼠的体重变化及血脂水平 饲养前, 正常组和 AS 组大鼠的平均体重分别为 (0.208 ± 0.003) 和 (0.210 ± 0.005) kg, 两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。饲养 16 周后, 正常组的体重增幅显著高于 AS 组 ($P < 0.01$)。与正常组相比, AS 组的 TC、LDL-C 显著增高 (P 值均 < 0.01), TG、HDL-C 的差异均无统计学意义 (P 值均 > 0.05)。见表 1。

3 讨 论

大量研究结果证实, AS 斑块富集活化的各种炎性细胞, 如巨噬细胞和 T 淋巴细胞, 并证实 AS 是动脉血管壁对损伤和刺激的慢性炎症和免疫反应, 固有的和适应性免疫炎症参与此疾病的发生和发展过程^[1]。众多的基础实验证实, CD4⁺ T 淋巴细胞及其分泌的细胞因子如 IL-2、IFN- γ 有促 AS 作用^[7-9]; 临床试验结果则表明, 自身免疫性疾病中 AS 相关的心血管的并发症和死亡率显著增加, 其机制支持 T 淋巴细胞介导的免疫炎症显著促进此类疾病 AS 的发生和进展^[10-11]。在参与炎症反应的细胞中, T 淋巴细胞处于主导地位, 通过分泌 IL-2、IFN- γ 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等细胞因子, 在促进其自身活化增殖的同时调节其他细胞的活化, 以巨噬细胞为显著, 巨噬细胞吞噬大量脂质后成为巨噬泡沫细胞^[12]。

T 淋巴细胞的活化、细胞因子的分泌、细胞的增殖依赖于细胞膜上离子通道的电生理活性^[3]。T 淋巴细胞膜上的 Kv1.3 通道的表达和功能改变通过影响膜电位水平和胞内钙信号, 维持 T 淋巴细胞的活化状态, 从而调节细胞增殖和细胞因子的产生。Kv1.3 通道属于电压门控钾通道 Shaker 家族成员, 是由约 500 个氨基酸的亚单位非共价结合形成的同源四聚体, 激活阈值为 -60 mV, $-10 \sim 0$ mV 达到稳态, 单通道电导为 $10 \sim 12$ pS。其相对限制性地分布于免疫系统和中枢神经系统。激活状态下, Kv1.3 通道在效应记忆 T 淋巴细胞的数量从原来 $200 \sim 300$ 个细胞显著上调至

1 500个细胞,钾离子外流使膜电位趋向于负电位水平,为 Ca^{2+} 持续内流提供电驱动力,以保障细胞活化必须的胞内 Ca^{2+} 浓度,升高的 Ca^{2+} 浓度激活钙调蛋白依赖于钙调磷酸酶,引起活化的 T 淋巴细胞核因子等转录因子通路的级联反应,调节 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 等细胞因子的表达,并在细胞增殖中发挥重要作用^[3,13-14]。

近年国内学者研究发现, $\text{Kv}1.3$ 在巨噬细胞向泡沫细胞分化的过程中发挥着关键的作用,阻断 $\text{Kv}1.3$ 和 $\text{Kir}2.1$ 将抑制人巨噬细胞源性泡沫细胞的分化,推测其可能是巨噬细胞源性泡沫细胞形成的分子及电生理学基础^[5]。

鉴于 $\text{Kv}1.3$ 在 T 淋巴细胞活化和巨噬细胞向泡沫细胞分化过程中所扮演的角色,而 T 淋巴细胞和巨噬细胞正是 AS 斑块中重要的免疫细胞, $\text{Kv}1.3$ 将有可能成为 AS 免疫防治的共焦(或双向)靶点。本研究通过建立 AS 模型,检测动脉病变局部 $\text{Kv}1.3$ 在转录和翻译水平上的表达变化,结果显示 AS 组在 RNA 水平和蛋白水平均高于正常组。AS 病变局部 $\text{Kv}1.3$ 表达增高,源于病变局部 T 淋巴细胞和巨噬细胞的浸润,而 $\text{Kv}1.3$ 正是相对限制性表达淋巴系统和神经系统,再次证明免疫机制在 AS 的病程中发挥重要作用。我们也发现,AS 病变局部细胞因子 IL-2、IFN- γ 蛋白水平表达显著高于正常组,符合以前学者证实的 IL-2、IFN- γ 具有促 AS 的作用。AS 病变局部浸润的免疫细胞的细胞膜上 $\text{Kv}1.3$ 通道开放,一方面促进巨噬细胞向泡沫细胞分化,巨噬细胞作为抗原提呈细胞,将激活 T 淋巴细胞;另一方面维持 T 淋巴细胞的活化状态,分泌细胞因子如 IL-2、IFN- γ ,从而促进 T 淋巴细胞分化增殖,细胞因子同时能激活巨噬细胞并促进其功能。由此可推测, $\text{Kv}1.3$ 在 AS 的发生和发展过程起着重要的作用。

由于目前尚无有效的分离 AS 斑块病变局部免疫细胞的方法,因此本研究未能从细胞水平观察淋巴细胞、巨噬细胞膜上 $\text{Kv}1.3$ 离子通道数目及离子单通道电流变化,从而证实 $\text{Kv}1.3$ 通道在 AS 中的作用机制。

依据本研究结果,结合免疫性疾病中阻断 $\text{Kv}1.3$ 可抑制效应性 T 淋巴细胞的活化,达到治疗疾病的效果,或许我们可以应用 $\text{Kv}1.3$ 通道阻滞剂选择性阻断 $\text{Kv}1.3$,抑制 AS 斑块 T 淋巴细胞活化和巨噬细胞向泡沫细胞的分化,从而防治

AS 的发生和发展。

参 考 文 献

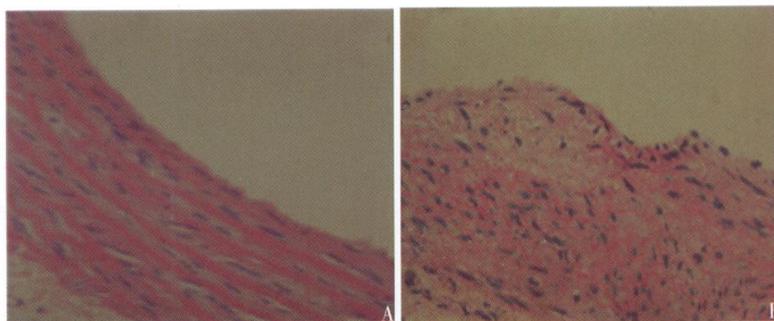
- Hansson G K, Libby P, Schönbeck U, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*, 2002, 91: 281-291.
- Hansson G K. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21: 1876-1890.
- Panyi G, Varga Z, Góspár R. Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol Lett*, 2004, 92: 55-66.
- Hu L, Pennington M, Jiang Q, et al. Characterization of the functional properties of the voltage gated potassium channel $\text{Kv}1.3$ in human $\text{CD}4^+$ T lymphocytes. *J Immunol*, 2007, 179: 4563-4570.
- 雷新军, 马爱群, 席雨涛, 等. 阻断电压依赖性钾通道 1.3 对人单核细胞源性巨噬细胞向泡沫细胞分化的抑制作用. *北京大学学报(医学版)*, 2006, 38: 257-261.
- Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ Method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, et al. Transfer of $\text{CD}4^+$ T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation*, 2000, 102: 2919-2922.
- Huber S A, Sakkinen P, David C, et al. T helper cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulation*, 2001, 103: 2610-2616.
- Upadhyay S, Mooteri S, Peckham N, et al. Atherogenic effect of interleukin 2 and antiatherogenic effect of interleukin 2 antibody in apoE deficient mice. *Angiology*, 2004, 55: 289-294.
- Sherer Y, Shoenfeld Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006, 2: 99-106.
- Roman M J, Salmon J E. Cardiovascular manifestations of rheumatologic diseases. *Circulation*, 2007, 116: 2346-2355.
- Robertson A K, Hansson G K. T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 2421-2432.
- Krasznai Z. Ion channels in T cells: from molecular pharmacology to therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2005, 53: 127-135.
- Panyi G, Vámosi G, Bodnár A, et al. Looking through ion channels: recharged concepts in T-cell signaling. *Trends Immunol*, 2004, 25: 565-569.

(收稿日期: 2009-10-11)

(本文编辑: 王小燕)

Kv1.3在动脉粥样硬化大鼠主动脉的表达变化

王 焱, 李桂阳, 李枚娟, 等 (正文见第186页)



A: 正常对照组; B: 动脉粥样硬化组

图1 正常对照组和动脉粥样硬化组大鼠主动脉组织病理学表现 (H-E染色, $\times 400$)

糖尿病大鼠骨骼肌病变发病机制初步探讨

项静燕, 赵玉武, 周 健 (正文见第190页)



图1 正常对照组的骨骼肌表现 (H-E染色, $\times 100$)

图2 糖尿病组的骨骼肌表现 (H-E染色, $\times 100$)

图3 正常对照组的b-FGF表达 (免疫组织化学染色, $\times 100$)

图4 糖尿病组的b-FGF表达 (免疫组织化学染色, $\times 100$)

图5 正常对照组的bcl-2表达 (免疫组织化学染色, $\times 100$)

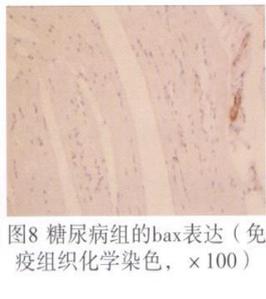


图6 糖尿病组的bcl-2表达 (免疫组织化学染色, $\times 100$)

图7 正常对照组的bax表达 (免疫组织化学染色, $\times 100$)

图8 糖尿病组的bax表达 (免疫组织化学染色, $\times 100$)

图9 正常对照组的Caspase3表达 (免疫组织化学染色, $\times 100$)

图10 糖尿病组的Caspase3表达 (免疫组织化学染色, $\times 100$)